Aus der Medizinischen Forschungsabteilung
der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. A. Pletscher

Vergleichende Wirkung von zwei Decarboxylasehemmern auf den Metabolismus von endogenem und exogenem 5-Hydroxytryptamin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von
ESTHER KUNZ
von Basel

1962

Imprimerie Sainte-Catherine
Bruges (Belgique)
1963

Aus der Medizinischen Forschungsabteilung
der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. A. Pletscher

Vergleichende Wirkung von zwei Decarboxylasehemmern auf den Metabolismus von endogenem und exogenem 5-Hydroxytryptamin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von
ESTHER KUNZ
von Basel

Imprimerie Sainte-Catherine
Bruges (Belgique)
1963

Von der medizinischen Fakultät genehmigt
auf Antrag von Prof. Dr. A. Pletscher

Tag der Promotion: 14. Dezember 1962

Erschienen im Arch. int. Pharmacodyn., 1964, *147*, 1-2.

AUS DER MEDIZINISCHEN FORSCHUNGSABTEILUNG DER
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.,
AKTIENGESELLSCHAFT, BASEL (SCHWEIZ)

VERGLEICHENDE WIRKUNG VON ZWEI DECARBOXYLASEHEMMERN AUF DEN METABOLISMUS VON ENDOGENEM UND EXOGENEM 5-HYDROXYTRYPTAMIN

VON

ESTHER KUNZ (1)

(Eingegangen am 27-1-1963).

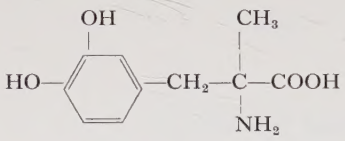
α-Methylierte Aminosäuren, z.B. α-Methyl-3,4-Dihydroxyphenylalanin (α-Methyl-Dopa), hemmen die Bildung von Monoaminen, wie 5-Hydroxytryptamin (5HT), 3-Hydroxytyramin (Dopamin), aus exogenen (d.h. von aussen zugeführten) Aminosäuren, wie 5-Hydroxytryptophan (5HTP), Dopa, *in vitro* und *in vivo*. Diese Wirkung beruht wahrscheinlich auf Hemmung der Decarboxylase aromatischer Aminosäuren (DCO) (1–4).

α-Methylierte aromatische Aminosäuren vermindern ferner den Gehalt von endogenen (aus im Gewebe vorhandenen Substraten gebildeten) Monoaminen, z.B. Noradrenalin, Dopamin, 5HT, in verschiedenen Organen. Die Herabsetzung von endogenem Noradrenalin in Herz und Gehirn scheint hingegen nicht auf DCO-Hemmung, sondern auf Monoaminfreisetzung zu beruhen. Die relativ geringfügige Verminderung des 5HT-Gehaltes im Gehirn durch α-Methyl-Dopa ist umstritten. Teils wird sie auf DCO-Hemmung, teils auf 5HT-Verdrängung zurückgeführt (5–10).

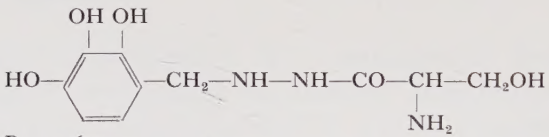
Kürzlich wurden DCO-Hemmer aus einer anderen chemischen Klasse (Hydrazinderivate) beschrieben, die DCO *in vitro* und *in vivo* je nach Organ 10–100mal stärker hemmen als α-methylierte aromatische Aminosäuren. Diese Substanzen vermindern auch den 5HTP- und

(1) Arbeit unter der Leitung von Prof. A. PLETSCHER.

Dopa-bedingten 5HT- resp. Dopamin-Anstieg sowie den Gehalt an endogenen Monoaminen (11–16). Ein systematischer Vergleich zwischen α-methylierten Aminosäuren und Hydrazinderivaten in bezug auf Beeinflussung des Stoffwechsels von exogenen und endogenen Monoaminen *in vivo* wurde bisher aber nicht ausgeführt. Eine solche Untersuchung scheint interessant, da sie möglicherweise weiteren Aufschluss gibt über die Wirkungsweise von DCO-Hemmern auf den Monoaminstoffwechsel *in vivo*. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von α-Methyl-Dopa und eines DCO-Hemmers vom Hydrazintyp (Ro 4-4602 = N-(DL-Seryl)-N′-2, 3, 4-trihydroxybenzyl)-hydrazin) auf den 5HTP bedingten 5HT-Anstieg in Gehirn und Herz sowie den Gehalt an endogenem 5HT im Gehirn verglichen.



α-Methyl-Dopa



Ro 4-4602

Methodik

Wistar Albino-Ratten von 60–80 g erhielten nach 16-stündigem Fasten α-Methyl-Dopa oder Ro 4–4602 i.p. Einem Teil der Tiere wurden 1 Std. nach diesen Pharmaca 75 mg/kg DL-5HTP s.c. injiziert. Nach Decapitation erfolgte spektrophotofluorimetrische Messung (17) des Gehaltes an endogenem 5HT im Gehirn resp. des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges in Herz und Gehirn. Um im Gehirn einen vergleichbaren absoluten 5HT-Anstieg durch 5HTP wie im Herzen zu erreichen, erhielten die Tiere in den Gehirn-Versuchen einen lang wirkenden Monoaminoxydase (MAO)-Hemmer (Pargylin [1], 100 mg/kg i.p.) 16 Std. vor den DCO-Hemmern. Unbehandelte Ratten sowie Tiere, die lediglich 5HTP resp. Pargylin + 5HTP erhalten hatten, dienten als Kontrollen.

Resultate

1. Der 5HTP-bedingte 5HT-Anstieg in Gehirn und Herz wird sowohl durch α-Methyl-Dopa als durch Ro 4–4602 gehemmt. Letzteres

[1] Pargylin = N-Methyl-N-benzyl-2-propinylamin.

bewirkt eine initiale Verstärkung des 5HT-Anstieges im Gehirn. In beiden Organen ist die Wirkung von Ro 4–4602 stärker als diejenige von α-Methyl-Dopa. Die α-methylierte aromatische Aminosäure zeigt in Herz und Gehirn einen ungefähr gleich starken Effekt, während Ro 4–4602 im Herzen stärker wirksam ist als im Gehirn. Eine totale oder subtotale Hemmung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges wird in Herz und Gehirn mit ca. 1,44 mMol/kg (300 mg/kg) α-Methyl-Dopa erreicht, während Ro 4–4602 den 5HT-Anstieg in Herz und Gehirn in Dosen von 0,24 mMol/kg resp. 0,68 mMol/kg (70 resp. 200 mg/kg) vollständig hemmt. Die ED_{50} (Dosis, die 50 %ige Hemmung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges bewirkt) beträgt: für α-Methyl-Dopa im Herzen 0,24 mMol/kg (50 mg/kg), im Gehirn 0,33 mMol/kg (68 mg/kg); für Ro 4–4602 im Herzen 0,002 mMol/kg (0,5 mg/kg), im Gehirn 0,054 mMol/kg (16 mg/kg). (Fig. 1)

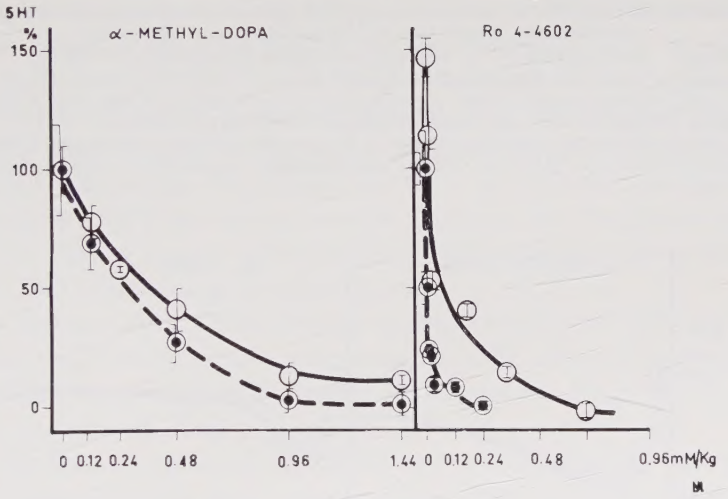


Fig. 1

Verminderung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstiegs in Gehirn und Herz von Ratten durch α-Methyl-Dopa und Ro 4-4602

α-Methyl-Dopa (i.p.) wurde 2 Std., Ro 4-4602 (i.p.) 1 Std. vor 75 mg/kg 5HTP (s.c.) injiziert. Messung des 5HT-Gehaltes 1/2 Std. nach 5HTP.

Ordinate: 5HTP-bedingter 5HT-Anstieg in % von Kontrollen, die lediglich 5HTP resp. Pargylin + 5HTP (1) erhielten (= 100 %).

Abszisse: Dosis von α-Methyl-Dopa resp. Ro 4-4602 in mMol/kg.

———— Herz.

– – – – Hirn.

Die Punkte bedeuten Mittelwerte aus je 4–10 Experimenten mit mittlerem Fehler. Absolute Zunahme des 5HT-Gehaltes in γ/g Frischgewebe nach 5HTP allein:

Gehirn: 1,40 ± 0,04
Herz: 2,16 ± 0,17

(1) Siehe Methodik Seite 400.

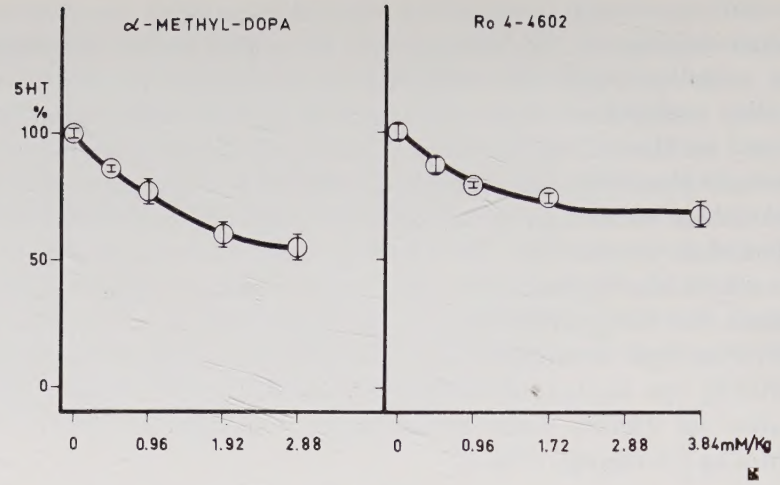


FIG. 2

Veränderung des Gehaltes an endogenem 5HT im Gehirn von Ratten nach i.p. Injektion verschiedener Dosen von α-Methyl-Dopa resp. Ro 4-4602

Ordinate: 5HT-Gehalt in % von unbehandelten Kontrollen (= 100 %).
Abszisse: Dosis der Medikamente in mMol/kg.
Der 5HT-Gehalt wurde 2 Std. nach Injektion von α-Methyl-Dopa und 1 Std. nach Ro 4-4602 (Zeitpunkt der maximalen Pharmaca-Wirkung) bestimmt.
Die Punkte bedeuten Mittelwerte aus 4–8 Experimenten mit mittlerem Fehler.
Absolut-Werte von 5HT im Gehirn unbehandelter Kontrollen: 0,57 ± 0,03.

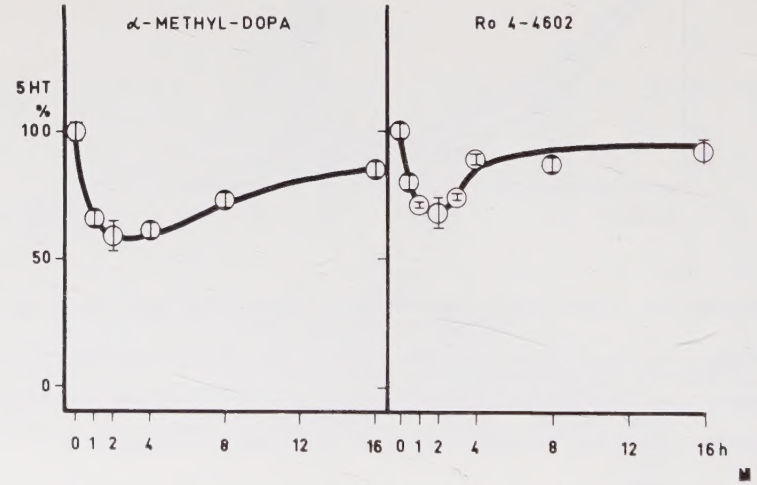


FIG. 3

Zeitliche Veränderung des Gehaltes an endogenem 5HT im Gehirn von Ratten nach i.p. Injektion von 1,90 mMol/kg α-Methyl-Dopa resp. Ro 4-4602

Ordinate: 5HT-Gehalt in % von unbehandelten Kontrollen (= 100 %).
Abszisse: Zeit in Stunden nach Applikation der DCO-Hemmer.
Die Punkte bedeuten Mittelwerte aus 4–8 Experimenten mit mittlerem Fehler.
Absolut-Werte von 5HT im Gehirn unbehandelter Kontrollen: 0,57 ± 0,03.

2. Der Gehalt an endogenem 5HT im Gehirn wird sowohl durch α-Methyl-Dopa als durch Ro 4–4602 in Abhängigkeit von der Dosis der Pharmaca herabgesetzt. Der maximale 5HT-Abfall beträgt aber nur 30 resp. 50 %. In hohen Dosen ist α-Methyl-Dopa signifikant wirksamer als Ro 4–4602 ($p > 0{,}01$). Auch der zeitliche Verlauf des 5HT-Abfalls nach Ro 4–4602 und α-Methyl-Dopa ist verschieden. So tritt die maximale 5HT-Senkung 1–2 Std. nach Ro 4–4602 und 2–4 Std. nach α-Methyl-Dopa auf; 16 Std. nach α-Methyl-Dopa und 4 Std. nach Ro 4–4602 sind die Ausgangswerte wieder erreicht. (Fig. 2 und 3)

Diskussion

Die Herabsetzung und vollständige Aufhebung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges in Herz und Gehirn zeigt, dass Ro 4–4602 und α-Methyl-Dopa *in vivo* starke Hemmung der 5HTP-Decarboxylierung bewirken. Ro 4–4602 ist gemessen an der ED_{50} im Gehirn 6mal, im Herzen 100mal stärker wirksam als α-Methyl-Dopa. Das endogene 5HT im Gehirn wird durch beide DCO-Hemmer in relativ geringem Masse herabgesetzt (maximal 50 %) und α-Methyl-Dopa zeigt dabei eine stärkere Wirkung als Ro 4–4602. Aus diesen Befunden darf geschlossen werden, dass eine praktisch vollständige Hemmung der DCO *in vivo* nur geringgradige Senkung des 5HT im Gehirn bewirkt und dass die Herabsetzung von 5HT im Gehirn durch α-Methyl-Dopa nicht oder höchstens teilweise durch DCO-Hemmung zustande kommt.

Der Befund, dass DCO-Hemmung die Bildung von 5HT aus injiziertem 5HTP stark hemmt, das endogene 5HT aber nur geringgradig beeinflusst, kann nicht mit Sicherheit erklärt werden. Folgende Möglichkeiten kommen in Frage:

1. Die Decarboxylierung von 5HTP ist in der Bildung von endogenem 5HT wahrscheinlich keine geschwindigkeitsbestimmende Stufe (18). Andere, langsamer vor sich gehende Teilreaktionen, z.B. die Ringhydroxylierung von Tryptophan, scheinen die Geschwindigkeit der Biosynthese von endogenem 5HT zu bestimmen. Bei der Bildung von 5HT aus exogenem 5HTP ist DCO jedoch das einzige geschwindigkeitslimitierende Enzym. Eine geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist aber viel empfindlicher auf Hemmstoffe als eine nicht-geschwindigkeitslimitierende.

2. Durch die heute verwendeten analytischen Methoden werden die gesamten nicht-konjugierten Amine erfasst. Die endogenen Monoamine sind wahrscheinlich in verschiedener Form in den Geweben vorhanden, z.B. als gespeicherte und als „freie" Amine (19–22). Die „freien" Amine

stellen wahrscheinlich einen geringen Teil der Totalamine dar, haben aber einen hohen Turnover. Für die gespeicherten Amine scheint das Umgekehrte der Fall zu sein: relativ hoher Anteil der Gesamtamine, langsamer Turnover. Die Vermehrung von 5HT nach Administration grosser Mengen 5HTP ist dagegen wahrscheinlich im wesentlichen durch Anstieg von „freien" Aminen bedingt. Da letzterer im Gegensatz zum endogenen 5HT-Gehalt durch Decarboxylasehemmung relativ stark beeinflusst wird, scheinen Ro 4–4602 und α-Methyl-Dopa vor allem auf die „freien" und relativ wenig auf die gespeicherten Amine zu wirken.

Die Richtigkeit dieser Hypothesen muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Aus früheren Befunden geht hervor, dass das Herz im Gegensatz zum Gehirn 5HT aus dem Blut aufnimmt (23, 24). Die Wirkung von α-Methyl-Dopa und Ro 4–4602 auf den 5HTP-bedingten 5HT-Anstieg im Herzen ist deshalb möglicherweise nicht nur durch Hemmung von DCO im Herzen selbst bedingt. α-Methyl-Dopa und Ro 4–4602 vermindern auch die 5HTP-Decarboxylierung in anderen DCO-reichen Organen, z.B. der Niere und Leber (3, 15), was zu einer Beeinflussung des 5HT-Gehaltes im Blut und wahrscheinlich zu veränderter 5HT-Aufnahme durch das Herz führen kann. Die Veränderung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges im Herzen durch α-Methyl-Dopa und Ro 4–4602 reflektiert also möglicherweise zum Teil eine Hemmung der DCO in anderen Organen als im Herzen. Im Gehirn kommt hingegen die Wirkung der Decarboxylase-Hemmer auf den 5HTP-bedingten 5HT-Anstieg wahrscheinlich im wesentlichen durch Hemmung des Enzyms in diesem Organ selbst zustande. Die unterschiedliche Wirkung von Ro 4–4602 auf den 5HTP-bedingten 5HT-Anstieg in Gehirn und Herz könnte möglicherweise durch einr geringere Penetration des DCO-Hemmers in das Gehirn als in andere Organe erklärt werden.

Der initiale Anstieg von 5HT im Gehirn nach Ro 4–4602 ist nicht klar. Möglicherweise hängt er mit einer Aktivierung von DCO zusammen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen und aus früheren Befunden darf also geschlossen werden, dass Hemmung der DCO *in vivo* wahrscheinlich keine geeignete Massnahme ist, um den Totalgehalt von endogenen Monoaminen in Gehirn und Herz wesentlich zu vermindern.

Zusammenfassung

Die Wirkung von α-Methyl-3,4-Dihydroxyphenylalanin (α-Methyl-Dopa) und Ro 4–4602 (N-(DL-Seryl)-N-'(2, 3, 4-trihydroxzbenzyl)-

hydrazin) auf den durch 5-Hydroxytryptophan (5HTP) bedingten Anstieg von 5-Hydroxytryptamin (5HT) sowie den Gehalt von endogenem 5HT wurde bei Ratten verglichen. Beide Pharmaca bewirken starke Hemmung des 5HTP-bedingten 5HT-Anstieges; Ro 4–4602 war im Gehirn und besonders im Herzen stärker wirksam als α-Methyl-Dopa. Das endogene 5HT des Gehirns wurde nur geringgradig herabgesetzt, wobei α-Methyl-Dopa stärkere Wirksamkeit zeigte als Ro 4–4602. Es wird geschlossen, dass selbst hochgradige Hemmung der Decarboxylase aromatischer Aminosäuren (DCO) *in vivo* höchstens geringgradige Senkung des endogenen 5HT bewirkt und dass die durch α-Methyl-Dopa bedingte Senkung des endogenen 5HT nicht oder höchstens zum Teil auf DCO-Hemmung beruht.

Literatur

1. — Sourkes, T. L. *Arch. Biochem.*, 1954, *51*, 444.
2. — Sourkes, T. L. und Murphy, G. F. *Fed. Proc.*, 1960, *19*, 295.
3. — Porter, C. C., Totaro, J. A. und Leiby, C. M. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1961, *134*, 139.
4. — Murphy, G. F. und Sourkes, T. L. *Arch. Biochem.*, 1961, *93*, 338.
5. — Hess, S. M., Connamacher, R. H., Ozaki, M. und Udenfriend, S. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1961, *134*, 129.
6. — Sourkes, T. L., Murphy, G. F., Chavez, B. und Zielinska, M. *J. Neurochem.*, 1961, *8*, 109.
7. — Hess, S. M. *Pharmacologist*, 1961, *3*, 77.
8. — Costa, E., Gessa, G. L., Hirsch, C., Kuntzman, R. und Brodie, B. B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, *96*, 118.
9. — Carlsson, A. und Lindqvist, M. *Acta Physiol. scand.*, 1962, *54*, 87.
10. — Sharman, D. F. und Smith, S. E. *J. Neurochem.*, 1962, *9*, 403.
11. — Hirsch, C. W., Kuntzman, R. und Costa, E. *Fed. Proc.*, 1962, *21*, 364.
12. — Brodie, B. B., Kuntzman, R., Hirsch, C. W. und Costa, E. *Life Sci.*, *1962*, 81.
13. — Drain, D. J., Horlington, M., Lazare, R. and Poulter, G. A. *Life Sci.*, *1962*, 93.
14. — Hansson, E. und Clark, W. G. *Pharmacologist*, 1962, *4*, 149.
15. — Burkard, W. P., Gey, K. F. und Pletscher, A. *Experientia* (Basel), 1962, *18*, 411.

16. — Pletscher, A. und Gey, K. F. *Biochem. Pharmacol.*, 1963, *12*, 223.
17. — Bogdanski, D. F., Pletscher, A., Brodie, B. B. und Udenfriend, S. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1956, *117*, 82.
18. — Erspamer, V., in Jucker, E. *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, 1961, *3*, 180.
19. — Brodie, B. B. und Shore, P. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *66*, 631.
20. — Green, J. P. Advances in Pharmacology, Bd. 1 (Academic Press Inc., Publishers, New York 1962) S. 349.
21. — Potter, L. T., Axelrod, J. und Kopin, I. J. *Biochem. Pharmacol.*, 1962, *11*, 254.
22. — Kuntzman, R., Costa, E., Creveling, C., Hirsch, C. W. und Brodie, B. B. *Life Sci.*, *1962*, 85.
23. — Shore, P. A., Pletscher, A., Tomich, E. G., Carlsson, A., Kuntzman, R. und Brodie, B. B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, *66*, 609.
24. — Pletscher, A., Gey, K. F. und Zeller, P., in Jucker, E. *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, 1960, *2*, 482.

CURRICULUM VITAE

6. Febr. 1934	geboren in Basel
1941 - 1944	Primarschule in Basel
1945 - 1953	Mädchengymnasium Basel, Gymnasialabteilung, Eidg. Maturitätsdiplom 1.4.53
April 1953 - Febr. 1954	Auslandsjahr in Cambridge (England)
April 1954	Immatrikulation an der medizinischen Fakultät der Universität Basel
16. Sept. 1955	Naturwissenschaftliche Prüfung für Ärzte
9. März 1957	Anatomisch-physiologische Prüfung für Ärzte
Herbst 1958	I. Praktikum auf der 2. medizinischen Abteilung des Bürgerspitals Basel
Winter 1958/59	Auslands-Semester an der medizinischen Fakultät der Universität Wien
Herbst 1959	II. Praktikum an der 1. medizinischen Abteilung des Bürgerspitals Basel
August 1960	Famulatur am Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhaus, 1. innere Abteilung, Berlin
17. Nov. 1961	Staatsexamen in Basel, Arzt-Diplom
ab Jan. 1962	Medizinische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel. Arbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Pletscher und Dissertation
14. Dez. 1962	Doktorpromotion, Medizinische Fakultät der Universität Basel

* * *

Zum Schluss möchte ich noch Herrn Prof. Dr. A. Pletscher meinen Dank aussprechen für die gründliche Schulung und Weiterausbildung auf dem Gebiete der medizinischen Forschung.